Les ions de métaux lourds et le problème de la détermination embryonnaire chez les Échinodermes

by R. LALLIER[1]

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris

INTRODUCTION

LES recherches sur l'action des ions lithium et sulfocyanure sur le développement de l'œuf d'oursin forment une importante contribution au progrès de nos connaissances dans le domaine de la détermination embryonnaire. Les effets végétativisants du lithium, découverts par Herbst (1892), confèrent à ce métal une situation assez exceptionnelle parmi les autres métaux alcalins et alcalino-terreux. En contraste, les métaux lourds présentent une toxicité généralement élevée. Leurs effets sur le développement ne sont toutefois pas uniformes et certains de ces métaux exercent une action différentielle sur les territoires embryonnaires. C'est ainsi que Waterman (1937) a observé que l'inhibition de la gastrulation s'accompagne d'un processus d'ectodermisation chez les embryons d'oursins cultivés en présence de sels de métaux lourds. Nous avons montré d'autre part, les effets animalisants très puissants des sels de zinc et de cadmium sur l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*, Lallier (1955*a*).

Dans ce travail, nous abordons l'étude de l'action animalisante du zinc. Dans ce but, nous comparons les effets du zinc avec ceux d'autres métaux présentant des propriétés voisines. Le nickel, le cobalt, le manganèse et le fer ont été choisis. En fonctionnant à la valence 2, ces métaux présentent de nombreux caractères communs avec le zinc.

La répartition du zinc fixé sur les embryons est examinée à divers stades du développement et dans des conditions expérimentales variées. Le métal est mis en évidence par la formation d'un complexe coloré avec la dithizone.

L'addition de substances spécifiques de groupes chimiques déterminés à des cultures faites en présence de sels métalliques a permis d'aborder le problème de la fixation des ions métalliques. L'acide p. chloromercuribenzoïque est utilisé en raison de son affinité pour les groupes sulfhydriles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ces expériences sont faites sur les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Les œufs sont utilisés $\frac{1}{2}$ heure après la fécondation. Le volume de chaque culture est

[1] *Author's address*: Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre Curie, Paris 5e, France.

[J. Embryol. exp. Morph. Vol. 4, Part 3, pp. 265–278, September 1956]

de 100 cc. La température est de 21 à 23° C. Des cultures de contrôle sont faites en bloquant préalablement l'ion métallique par un agent complexant, l'acide éthylènediamino-tétra-acétique (Complexone) utilisé à la concentration de 0,05/100 sous forme de sel tétrasodique. Les sels métalliques chimiquement purs (Rhône-Poulenc) sont utilisés pour la préparation des solutions stocks dans l'eau de mer: $ZnCl^2$ 1/1 000, $NiCl^2$ $6H^2O$ 1/1 000, $CoCl^2$ $6H^2O$ 1/1 000, $MnCl^2$ $4H^2O$ 1/1 000. Des solutions de SO^4Fe $7H^2O$ à 1/100 et à 1/1 000 dans l'eau distillée sont préparées au moment de l'emploi.

Nous rappellerons qu'en ce qui concerne la solution de $ZnCl^2$ dans l'eau de mer, 60 pour cent du Zn précipite sous forme d'hydroxyde insoluble. La concentration réelle de la solution ne représente que 40 pour cent de la concentration théorique. Par mesure d'homogénéité les valeurs des concentrations sont indiquées en fonction de la dilution de la solution à 1/1 000.

Pour la détection des métaux dans les embryons nous utilisons des réactifs organiques donnant une réaction colorée caractéristique. Les indications détaillées sur ces réactifs et leur mode d'emploi figurent dans l'ouvrage de Bernot (1947). La détermination des métaux est faite sur lame creuse en mélangeant 3 gouttes d'une suspension d'embryons avec 1 goutte de réactif correspondant au métal recherché. Les réactifs suivants préparés au moment de l'emploi sont utilisés:

Zinc: solution saturée de dithizone dans l'alcool à 70°.

Nickel: solution alcoolique de diméthylglyoxime à 1 pour cent, solution alcoolique de α-furil-dioxime à 2 pour cent.

Mercure: solution saturée de diphénylcarbazone dans l'alcool à 90°.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Sels métalliques et développement

Tous les métaux sont utilisés à l'état bivalent. Ce sont les chlorures de nickel, de cobalt, de manganèse et le sulfate ferreux.

Chlorure de nickel. 11 séries expérimentales complètes ont été effectuées avec des résultats constants d'une série à l'autre.

Dans les solutions à 1/1 000, le développement est retardé. Après 23 heures, les embryons sont au stade blastula, 50 pour cent sont écloses. L'épaississement apical est peu marqué et recouvert de cils courts. Après 48 heures, tous ces embryons sont éclos. Ils sont sphériques avec des parois très minces. L'archentéron, les spicules et les cellules pigmentaires manquent. Deux groupes cellulaires opacifiés, étalés à la face interne de l'embryon, l'un au pôle animal, l'autre au pôle végétatif, sont tantôt isolés, tantôt réunis par une travée cellulaire opaque. On trouve en outre quelques rares gastrulas munies d'une petite vésicule archentérique. Celle-ci se désintègre le jour suivant et est remplacée par un groupe de cellules opacifiées. Ces embryons laissés 5 ou 6 jours dans la solution ne s'y développent pas et leur taille diminue sensiblement. Reportés dans l'eau

de mer après un séjour de 23 heures seulement, ils prennent l'aspect que nous venons de décrire. Ils sont tous lysés le lendemain de leur transfert.

Dans les solutions à 1/5 000, le ralentissement du développement est moins accentué. Dans les cultures de 23 heures, toutes les blastulas sont écloses. Elles sont légèrement allongées selon leur axe animal-végétatif et leurs contours sont plissés. L'épaississement ectodermique apical est peu marqué et recouvert de cils courts. Une petite ébauche archentérique est formée chez de nombreux embryons. Les spicules manquent. Observés 24 heures plus tard, ces embryons se signalent par une légère extension en forme de lobe de la zone apicale. L'ectoderme est épaissi à ce niveau et recouvert de cils courts. Le pôle anal est entouré par une bande d'ectoderme épaissie recouverte de cils courts. L'archentéron est encore réduit à une petite vésicule. Les cellules mésenchymateuses sont rares et opacifiées. Les spicules et les cellules pigmentaires manquent. Ces embryons peuvent être laissés dans la solution pendant plusieurs jours, souvent une semaine, tout en restant parfaitement viables, mais ils présentent alors une régression caractéristique. Les parois et les zones ciliées s'amincissent progressivement. L'archentéron se désintègre et il est remplacé par un groupe de cellules opacifiées. L'embryon tend à devenir sphérique, ses parois s'amincissent considérablement. C'est à peine si l'on remarque un léger épaississement au pôle apical et au niveau de la bande ciliée anale. Ces phénomènes s'accompagnent d'une diminution souvent considérable et d'ailleurs variable de la taille de l'embryon. Voici les mesures en μ des diamètres de différents embryons dans une culture de 5 jours: 128, 106, 96, 85, 75, 54, 43, et 32. Les plus petits de ces embryons sont compacts et opaques. La survie relativement prolongée de ces embryons contraste avec leur faible viabilité lorsqu'ils sont transférés dans l'eau de mer après 23 heures seulement de culture dans les solutions de $NiCl^2$. Ils se lysent en effet sans se développer, quelques heures après leur report dans l'eau de mer.

Dans les solutions à 1/10 000, les embryons après 48 heures ressemblent à ceux développés dans les solutions à 1/5 000. Ils en diffèrent par leur archentéron mieux développé et la présence de spicules pairs, épineux. Reportés dans l'eau de mer après 23 heures de séjour dans la solution de $NiCl^2$, ils conservent cet aspect général et leur archentéron se différencie en trois segments. Ils se lysent d'ailleurs rapidement après ce transfert.

Dans les cultures de contrôle en présence de Complexone ($NiCl^2$ 1/5 000 et Complexone 0,05/100), le développement est normal.

Dans les solutions plus diluées 1/50 000 et 1/100 000, le retard du développement est peu sensible. Les pluteus ont un lobe oral très développé, bordé d'un ectoderme épais recouvert de longs cils. Les bras anaux manquent (1/50 000) ou sont rejetés latéralement de part et d'autre du lobe oral (1/100 000). La région sommitale peu développée est arrondie. Les trois segments de l'archentéron sont formés. La bouche est présente à la base du lobe oral, moins fréquemment toutefois dans les solutions à 1/50 000. A cette concentration, les spicules au nombre de 3 ou 4 en général, très épineux, enchevêtrés, forment une

couronne entourant la base de l'archentéron. Les embryons restent viables plus longtemps dans les solutions à 1/100 000, mais ils régressent progressivement atteignant après une semaine le tiers ou la moitié de leur taille initiale.

Chlorure de Cobalt. Cinq séries d'expériences ont été faites. Peu de différences ont été observées entre chaque série.

Dans les solutions à 1/5 000, le développement est ralenti. Après 24 heures, ces cultures ne contiennent encore que de jeunes gastrulas, pour la plupart en voie d'éclosion, tandis que les témoins sont déjà de petits pluteus. Des embryons restent bloqués aux stades morula et blastula. Leur pourcentage varie selon les pontes, mais il ne dépasse guère 10 pour cent du total.

Dans les cultures de 48 heures, toutes les gastrulas sont écloses. Elles portent au pôle végétatif de nombreuses expansions en forme de bourgeons épais recouverts de cils courts. Partout ailleurs, les parois sont minces et recouvertes de cils courts, même au pôle animal. L'archentéron est réduit à une petite vésicule. Les cellules pigmentaires sont tassées à la base de cet archentéron. Les spicules manquent. Chez quelques rares gastrulas, l'ectoderme apical est plissé. L'archentéron plus développé s'étend jusqu'au pôle animal. Ces embryons sont peu mobiles et leur viabilité est faible. Ils sont tous lysés après 3 jours de culture. Leur transfert dans l'eau de mer, après un séjour limité à 23 heures, améliore leur développement. Les embryons prennent alors une structure prismatique plus ou moins marquée. Le tube digestif se différencie en trois segments. Les spicules, au nombre de 3 ou 4, sont petits et épineux. On rencontre en outre de rares formes plutéiques avec un lobe oral hyperdéveloppé et des bras anaux réduits. Tous ces embryons sont peu viables et ils ne peuvent être cultivés plus longtemps que ceux laissés dans la solution de $CoCl^2$.

Dans les cultures de contrôle, en présence de Complexone ($CoCl^2$ 1/5 000 + Complexone 0,05/100), le développement est normal.

Aux concentrations 1/10 000 et 1/50 000, le retard du développement est peu sensible. Ces pluteus de petite taille ont une forme générale globuleuse. Les bras anaux et le lobe oral sont peu développés. La bouche manque (1/10 000). Les spicules sont épineux.

Reportés dans l'eau de mer après un séjour de 23 heures, ces embryons se développent en pluteus avec des bras anaux irrégulièrement orientés. Les spicules sont épineux. La bouche est présente.

Chlorure de manganèse. Trois cultures ont été faites avec le chlorure de manganèse. Dans les solutions à 1/5 000, le développement est très légèrement ralenti. Dans les cultures de 48 heures le développement des bras anaux et de la partie sommitale est inhibé. Chez 50 pour cent des embryons la bouche n'est pas formée. Les autres sont des pluteus de structure normale, plus petits que les témoins.

Dans les solutions à 1/10 000, les embryons ne se distinguent guère des témoins. Seuls quelques uns présentent une légère inhibition du développement de la partie sommitale et des bras anaux.

Sulfate ferreux. Trois cultures ont été faites avec le sulfate ferreux. Une partie appréciable du fer précipite à l'état d'hydroxyde diminuant ainsi la concentration effective des ions Fe^{++}. En outre l'oxydation de la solution par l'oxygène de l'air provoque la transformation rapide des ions ferreux en ions ferriques. En raison de ces considérations, les résultats indiqués ne présentent qu'un intérêt d'orientation.

Avec une concentration de 1 / 1 000, le développement est ralenti et la plupart des embryons ne dépassent pas le stade morula. Quelques rares pluteus se développent. Ils sont petits et ne dépassent pas les $\frac{3}{4}$ ou même la $\frac{1}{2}$ de la taille des témoins. L'abondance des cellules mésenchymateuses leur donne un aspect opaque.

Dans les solutions à 1 / 100 000, la gastrulation est retardée, mais les pluteus sont de taille et de structure normales.

Détermination du zinc et du nickel

La répartition du zinc est examinée au cours de l'animalisation et à différents stades du développement normal. La fixation du zinc sur des embryons préalablement végétativisés par le chlorure de lithium et les effets du Complexone et des ions mercuriques sur la répartition du métal sont également étudiés.

Les œufs vierges, laissés de $\frac{1}{2}$ à 12 heures dans une solution de $ZnCl^2$ à 1 / 10 000, développent une coloration rose en présence de dithizone. De légères différences sont observées entre les œufs d'une même ponte. Elles disparaissent avec la prolongation du traitement sans que celle-ci s'accompagne d'un accroissement marqué de la coloration.

Des œufs mis dès la fécondation dans une solution de $ZnCl^2$ à 1 / 10 000 sont prélevés au cours de leur développement et traités à la dithizone. Au stade 2 blastomères, la coloration rose peu intense est également répartie entre les 2 blastomères. L'intensité de la coloration s'accroît aux stades 32 et 64 blastomères tout en restant uniformément répartie. Ces embryons reportés dans l'eau de mer normale s'y développent. Au stade prismatique la coloration est repérée dans le mésenchyme primaire et secondaire et, à un moindre degré, dans les parois de l'archentéron. La coloration n'a pu être détectée dans les pluteus.

Les embryons laissés dans la solution de $ZnCl^2$ jusqu'au stade blastula sont fortement animalisés. L'extension de la touffe ciliée apicale correspond au type $\frac{3}{4}$ selon la terminologie de Hörstadius (1935). La coloration est intense au niveau des cellules mésenchymateuses. La coloration des parois ectodermiques est plus faible et apparaît uniformément répartie. Ces blastulas animalisées peuvent survivre quelques jours après leur transfert dans l'eau de mer normale. On observe alors une atténuation de la coloration par la dithizone, mais sa répartition n'est pas modifiée.

Des concentrations plus faibles ont été utilisées. Dans les solutions à 1/100 000, la coloration reste très faible pendant toute la segmentation. Le développement

ne dépasse pas le stade gastrula. Celles-ci portent au pôle végétatif de nombreuses expansions ciliées de la paroi. La coloration, générale à ce stade, est plus accentuée au niveau de ces expansions.

Dans une seconde série d'essais, les embryons choisis à un stade déterminé sont mis dans une solution de chlorure de zinc à 1/10 000, puis lavés et traités par la dithizone. La durée du séjour dans les solutions est variée. Elle est toutefois limitée avec les séjours trop prolongés, par la généralisation de la coloration et par la toxicité plus forte du Zn pour les stades avancés. Les séjours relativement courts nous ont donné les indications les plus suggestives sur l'aptitude des diverses parties de l'embryon à fixer le Zn.

Chez les blastulas rondes, munies de leur mésenchyme primaire, une coloration rose se développe au niveau de ce mésenchyme et dans une étroite zone au pôle végétatif, après 30 minutes de séjour dans la solution de $ZnCl^2$. Cette répartition de la coloration est conservée chez les embryons traités pendant 2 heures. Après un séjour de 4 heures ou plus, la coloration s'étend à tout l'embryon, elle reste néanmoins plus intense au niveau du mésenchyme.

Chez la gastrula avancée, un séjour de 10 minutes est suffisant pour que la coloration se développe au niveau du mésenchyme secondaire. Après 2 heures de traitement, la coloration s'étend au mésenchyme primaire et avec moins d'intensité toutefois aux parois de l'archentéron et à la périphérie du blastopore. Après 4,30 heures, la coloration s'étend à tout l'embryon. Elle reste plus marquée dans les mésenchymes et dans l'archentéron. La prolongation du traitement entraîne l'extension de la coloration à tout l'embryon.

La répartition de la coloration est semblable chez les jeunes stades prismatiques.

Chez les pluteus, après un séjour de 10 minutes à 2 heures, la coloration n'apparaît que dans les cellules pigmentaires à l'exclusion de toute autre région.

La répartition du zinc chez des embryons préalablement végétativisés par le chlorure de lithium est également examinée. Les embryons végétativisés sont obtenus en traitant les œufs fécondés, pendant 16 heures, dans la solution suivante: eau de mer 95 cc., LiCl (0,65 M) 5 cc. Ces embryons sont formés d'une petite vésicule ectodermique à parois minces et contours anguleux, contenant deux spicules ramifiés, des cellules pigmentaires et mésenchymateuses et d'un entoderme volumineux. Celui-ci complètement évaginé est formé de trois segments à parois épaisses correspondant respectivement à l'intestin antérieur, moyen et postérieur. Après un séjour de 10 minutes dans $ZnCl^2$ à 1/10 000, la coloration ne se développe qu'au niveau des cellules mésenchymateuses. Après 1 heure de séjour, les parois de l'entoderme apparaissent colorées, la coloration est plus accentuée au niveau du segment correspondant à l'intestin antérieur et plus faible dans le segment intermédiaire. Le segment postérieur ou anal n'est pas coloré. Le séjour des embryons dans la solution de $ZnCl^2$ ne peut guère être prolongé davantage car ils ne tardent pas à se lyser.

Dans ces recherches, les embryons sont lavés plusieurs fois à l'eau de mer

avant d'être traités par la dithizone. Nous avons également fait des lavages avec une solution de Complexone (1 pour cent) dans l'eau de mer. Ces deux méthodes de lavage donnent des résultats identiques.

Le problème du déplacement du zinc par certains métaux lourds étant lié par son aspect technique aux questions étudiées dans ce paragraphe, nous l'examinerons maintenant.

L'ion mercurique a été utilisé en raison de la grande stabilité de ses complexes avec les protéines. A cet effet des embryons ayant séjournés dans une solution de $ZnCl^2$ à 1/10 000 sont lavés et mis pendant 10 à 20 minutes dans une solution de $HgCl^2$ à 1/20 000. Après lavage, la coloration développée en présence de dithizone est orange très faible. Par contre, le mercure est facilement mis en évidence grâce à la coloration lie de vin qu'il développe en présence de diphénylcarbazone. Cette expérience peut être faite à tous les stades, mais les jeunes stades en cours de segmentation s'y prêtent tout particulièrement en raison de leur sensibilité plus faible à l'action lytique de l'ion mercurique.

Pour la détermination du nickel, les conditions sont moins favorables; les réactifs, l'α-furil-dioxime surtout, entraînant une opacification rapide des embryons. Aussi nous avons limité nos essais aux embryons sphériques développés dans les solutions de $NiCl^2$ à 1/1 000.

En présence de diméthylglyoxime, une coloration rose assez faible est repérée au niveau des cellules mésenchymateuses. L'α-furil-dioxime donne le même résultat. La détection du nickel est peu aisée dans ces conditions. Jusqu'ici seule la réaction au niveau des cellules mésenchymateuses se montre nettement positive. Il ne peut encore être décidé avec certitude s'il se fixe en d'autres régions.

Chlorure de zinc et acide p. chloromercuribenzoïque

Dans les cultures contenant $ZnCl^2$ à 1/10 000 et de l'acide p. chloromercuribenzoïque ($0{,}5 \times 10^{-5}$ M), la quasi totalité des embryons est bloquée aux stades 32 et 64 blastomères. On trouve en outre quelques rares blastulas à parois épaisses. Transférées dans l'eau de mer normale, elles se lysent sans se développer davantage.

En présence de $ZnCl^2$ à la concentration 1/10 000, tous les embryons sont des blastulas hyperciliées. Dans les solutions d'acide p. chloromercuribenzoïque ($0{,}5 \times 10^{-5}$ M) les embryons sont petits et globuleux. Le développement des bras est inhibé. L'archentéron est formé mais la bouche manque.

DISCUSSION

Les sels métalliques étudiés exercent des effets différents sur le développement de l'œuf de *Paracentrotus lividus*. Le développement est inhibé, de façon peu caractéristique, en présence de $MnCl^2$ et de SO^4Fe. $CoCl^2$ se montre plus toxique. A la concentration 1/5 000, la gastrulation est notablement perturbée.

Les effets du chlorure de nickel apparaissent plus caractéristiques. Dans les solutions à 1/1 000, l'archentéron ne se forme pas et l'entoderme s'intègre aux

parois de l'embryon par un processus d'ectodermisation déjà signalé par Waterman (1937). Il ne s'agit toutefois pas d'une animalisation typique puisque l'on n'observe ni accroissement de l'épaississement apical, ni extension de la touffe ciliée apicale. Celle-ci est d'ailleurs formée de cils courts. Dans les solutions plus diluées, les embryons présentent les caractères d'une organisation à symétrie radiale.

Les ions des métaux lourds sont responsables de l'action de ces sels métalliques sur le développement. Cette constatation découle des expériences montrant que le Complexone supprime les effets des sels de nickel et de cobalt. Nous avons également observé ce phénomène avec le chlorure de zinc (Lallier, 1955*a*). Les embryons sont soustraits à l'action de l'ion métallique, celui-ci étant masqué dans le complexe formé avec le Complexone.

Si l'on compare les effets du nickel avec ceux du zinc, on remarque des différences importantes. Le zinc est plus toxique que le nickel pour l'œuf d'oursin. En effet à la concentration 1/1 000, la segmentation est normale avec $NiCl^2$, elle est bloquée aux stades 16 et 32 avec $ZnCl^2$.

Le zinc est un agent animalisant très efficace. Avec $ZnCl^2$ à la concentration 1/10 000, tous les embryons sont des blastulas hyperciliées. L'extension de la touffe ciliée apicale correspond au type $\frac{3}{4}$ selon la terminologie de Hörstadius. Dans les solutions de $NiCl^2$ à 1/10 000, aucune blastula ne présente d'hyperdéveloppement de la plaque et de la touffe ciliée apicales.

Enfin les embryons cultivés dans les solutions de $ZnCl^2$ à 1/500 000 présentent un type d'organisation à symétrie radiale[1] analogue à celui des embryons développés dans les solutions de $NiCl^2$ à 1/5 000 et 1/10 000. L'existence d'une telle similitude, malgré la différence énorme des concentrations en sels métalliques, met en évidence l'activité plus élevée du zinc sur le développement.

Cette tendance à la radialisation des embryons a également été observée avec d'autres substances: détergents (Gustafson & Sävhagen, 1950); 8-chloroxanthine (Hörstadius & Gustafson, 1954); colorants sulfoniques (Lallier, 1955*b*), persulfate de sodium (Lallier, 1955*c*). Avec ces colorants et le persulfate notamment, nous avons pu obtenir un effet animalisant avec des concentrations relativement élevées et un effet radialisant avec des concentrations plus faibles. Il apparaît donc que ces agents peuvent exercer une action animalisante ou radialisante selon la concentration utilisée. Le nickel et le zinc en sont un autre exemple.

Nous avons également signalé que les embryons cultivés de façon permanente dans les solutions de $NiCl^2$ subissent une diminution progressive de taille. Ce phénomène se présente également avec le persulfate de sodium et à un moindre degré avec $ZnCl^2$ et les colorants sulfoniques. La diminution de taille apparaît liée à la survie relativement longue des embryons dans ces conditions. Différents des pluteus, ces embryons en raison de leur structure ne peuvent se nourrir aux dépens des éléments du milieu. Après l'épuisement de leurs réserves vitellines,

[1] Dans un travail paru depuis l'envoi de ce mémoire, Rulon (*Biol. Bull. Wood's Hole*, 1955, **109**, pp. 316–27) a observé la radialisation des larves de Sand Dollar traitées par le chlorure de zinc.

l'attaque de certaines structures par les enzymes cellulaires apparaît nécessaire pour fournir l'énergie indispensable à leur survie. Ce phénomène rendrait compte de la régression générale de la taille de ces embryons. Ces considérations impliquent que chez ces embryons animalisés certaines structures restent accessibles à l'attaque des enzymes cellulaires et que celles-ci conservent leur pleine activité. L'étude de ces phénomènes est susceptible d'apporter des indications intéressantes sur le métabolisme et la structure de ces embryons.

Les ions de métaux lourds constituant les agents responsables des transformations morphologiques observées, l'analyse de leur mode d'action implique l'étude de leur répartition dans l'embryon et la détermination de la nature du support chimique responsable de leur fixation.

Nous avons examiné la répartition du zinc à divers stades du développement embryonnaire et dans des conditions variées. La méthode utilisée pour la détermination du zinc est basée sur la coloration pourpre qu'il donne avec la dithizone. Cette méthode a permis à Fujii (1954) de détecter le zinc dans le nucléole de l'oocyte d'oursin. Récemment Meier & Kaunat (1954) l'ont utilisée pour la mise en évidence du zinc dans le pancréas.

L'emploi de cette méthode appelle toutefois quelques remarques. Il apparaît en effet peu probable que la totalité du zinc puisse être mise en évidence dans ces conditions. Nous avons pu remarquer notamment que le complexe formé *in vitro* entre le zinc et le Complexone ne donne pas la coloration avec la dithizone. Des essais préliminaires nous ont montré qu'en présence de certains acides aminés, la coloration est plus ou moins atténuée. L'histidine, la glycine, la proline, la sérine, l'isoleucine, la thréonine, l'asparagine et l'acide aspartique se sont montrés particulièrement actifs à cet égard. Or le zinc forme des complexes assez stables avec l'histidine, ainsi d'ailleurs qu'avec d'autres acides aminés (Tanford, 1952; Albert, 1952; Perkins, 1953). Il apparaît donc que le zinc engagé dans certaines formations complexes ne peut être mis en évidence par la dithizone.

Nous ferons remarquer en outre, que l'addition de la solution alcoolique de dithizone provoquant des phénomènes de dénaturation protéiques, ceux-ci peuvent influer à leur tour sur la fixation des ions zinc, soit dans le sens d'une libération, soit au contraire dans le sens d'un accroissement de fixation du métal. Cette seconde éventualité est plausible et nous avons pu vérifier *in vitro* que le chauffage de l'ovalbumine en présence de traces de zinc entraîne une forte diminution de la coloration par la dithizone. Le renforcement de l'affinité de la protéine dénaturée pour le métal et l'accroissement de la stabilité des complexes formés apparaissent responsables de ce phénomène.

Ces remarques, tout en restreignant la possibilité de mettre en évidence par cette méthode la totalité du zinc fixé, ne touchent toutefois en rien la possibilité de détecter le métal engagé dans certaines combinaisons. Sans préjuger de la nature de ces combinaisons, nous ferons remarquer qu'un lavage préalable à l'eau ou avec une solution de Complexone n'empêche pas le développement de la coloration. Nous avons rendu compte de l'augmentation de l'intensité de la

coloration au cours du développement. Ce phénomène indique une fixation croissante de zinc et le stade blastula marque à cet égard un maximum. L'étude de la répartition de la coloration à diverses étapes du développement ainsi que chez les embryons végétativisés, indique d'une part une affinité plus grande du métal pour les régions végétatives et, d'autre part la diminution progressive de la fixation du métal avec les progrès de la différenciation. Nous avons vu que chez les pluteus, seules les cellules pigmentaires donnent une réaction colorée à la dithizone. Aux stades avancés du développement, les structures entodermiques dérivées du matériel initialement le plus végétatif sont également les plus sensibles aux effets toxiques du zinc; elles sont toujours lésées les premières. Un séjour prolongé dans la solution de $ZnCl^2$ entraîne l'extension de la fixation du zinc à tout l'embryon, et ce phénomène va de pair avec la généralisation de l'effet toxique du métal. Le zinc présente donc une grande affinité pour les régions végétatives, et ce phénomène est susceptible de rendre compte de l'orientation de leur développement en direction animale.

Une situation analogue se présente dans le cas du nickel. Bien que les recherches aient été plus limitées, nous avons pu remarquer dans les blastulas la haute affinité du métal pour le mésenchyme. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de réaction colorée dans les parois ectodermiques. Ces résultats indiquent une affinité assez faible du nickel pour les tissus embryonnaires et s'accordent avec les effets morphogènes moins marqués et la toxicité moins élevée de ce métal.

La fixation des ions métalliques sur les structures embryonnaires apparaissant ainsi responsable de leurs effets sur le développement, nous examinerons maintenant les différents supports chimiques présentant une affinité pour ces ions. Malgré les nombreux travaux consacrés à ce sujet, nos connaissances sur la nature et la stabilité des complexes formés avec les ions métalliques sont encore très restreintes. Ces problèmes ont fait l'objet de revues d'ensemble où le rôle physiologique de ces complexes est particulièrement examiné (Lehninger, 1950; Williams, 1953). L'ouvrage de Martell & Calvin (1952) traite des différents aspects de la chimie des complexes. Dans les conditions physiologiques, les ions forment des complexes avec de nombreuses substances jouant un rôle physiologique important, protéines, acides aminés, peptides, acides organiques et divers composés phosphorylés. Cette énumération n'est d'ailleurs pas exclusive. Nous ne considérerons ici que les complexes formés avec les protéines. En contraste avec les ions de métaux alcalins et alcalino-terreux, les ions de métaux lourds forment avec les protéines des complexes de stabilité élevée dans les conditions physiologiques normales. En général l'ordre de stabilité de ces complexes est pour les métaux étudiés ici: $Mn^{++}<Fe^{++}<Co^{++}<Ni^{++}<Cu^{++}<Zn^{++}$. La nature des groupes fonctionnels des protéines responsables de la fixation varie selon la nature de ces ions. Pour le zinc, la fixation est possible avec tous les groupes fonctionnels. Elle dépend toutefois de la concentration et de l'affinité relative du métal pour chaque groupe fonctionnel. C'est ainsi qu'à faible

concentration le zinc se lierait essentiellement aux groupes SH. Aux concentrations plus élevées, la fixation s'étend aux autres groupes.

Il est néanmoins possible de distinguer une affinité particulière pour certains groupes. Le zinc présente une affinité élevée pour les résidus histidine, Gurd & Goodman (1952). Les recherches sur les différents types de complexes métalliques ont montré que le nickel et le cobalt à l'état divalent présentent tous deux une affinité pour les composés azotés et oxygénés du type acides aminés. Le fer divalent présente en outre une affinité pour les groupes carboxyles. L'affinité pour les groupes carboxyles prédomine dans le manganèse.

Nous avons abordé l'étude de la détermination des groupes responsables de la fixation des ions zinc et l'emploi de substances présentant pour les protéines une affinité supérieure à celle des ions zinc s'est ainsi montré utile.

Nous basant sur le fait que les protéines forment avec l'ion mercurique des complexes plus stables qu'avec le zinc, nous avons examiné l'effet de cet ion sur la répartition du zinc dans l'embryon. Nous avons observé que le mercure déplace le zinc de ses combinaisons organiques dans l'embryon. Cette constatation nous indique que le mercure et le zinc ont des points de fixation communs. Il est intéressant de rappeler ici que Lindahl (1936) a montré qu'un très court passage de l'œuf de l'oursin dans une solution de $HgCl^2$ à 1/90 000 est suffisant pour provoquer l'animalisation. Il apparaît donc probable qu'en raison de la courte durée de ce traitement et de la faible concentration utilisée, la fixation de l'ion mercurique est restée limitée à certains groupes fonctionnels. Un traitement prolongé entraînant la fixation du mercure à tous les groupes fonctionnels disponibles empêche tout développement.

Afin de déterminer si la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles joue un rôle dans l'animalisation, nous avons utilisé l'acide p. chloromercuribenzoïque en raison de son affinité élective pour ces groupes (Hellerman, Chinard, & Deitz, 1943). Les embryons cultivés en présence de chlorure de zinc sont très sensibles à l'acide p. chloromercuribenzoïque et le développement est bloqué au cours de la segmentation. Il y a donc addition des effets toxiques et l'embryon n'est pas protégé contre les effets toxiques du zinc par l'acide p. chloromercuribenzoïque. Celui-ci utilisé seul ne provoque d'ailleurs aucune animalisation. Nous ferons également remarquer que le chlorure de zinc à très faible concentration provoque seulement la radialisation. L'affinité du métal pour les groupes sulfhydriles étant plus grande que pour les autres groupes, il apparaît ainsi que la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles prédomine dans ces conditions. Nous avons d'autre part remarqué que le cadmium bien que formant des complexes plus stables que le zinc avec les groupes sulfhydriles est un agent animalisant moins efficace que le zinc (Lallier, 1955*a*). Il apparaît donc peu probable que la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles joue un rôle déterminant dans l'animalisation.

L'analyse de l'action de divers oxydants et de l'acide p. chloromercuribenzoïque sur le développement de l'œuf d'oursin nous a d'ailleurs conduit à une conclusion analogue (Lallier, 1955*c*).

La fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles n'apparaissant pas jouer un rôle déterminant dans l'animalisation, il reste néanmoins d'autres groupes nombreux et variés capables de fixer le zinc et de se trouver ainsi à l'origine de son action sur la détermination embryonnaire.

A cet égard les groupes basiques, aminés notamment, présentent un intérêt particulier. Ils sont en effet très répandus, et ils forment facilement des complexes avec certains métaux lourds. Nous ferons remarquer ici que des colorants sulfoniques sont d'actifs agents animalisants (Lallier, 1955*b*). Or ces colorants possédant, grâce à leurs groupes sulfoniques acides, une affinité particulière pour les groupes basiques cellulaires, le rôle de ces groupes dans ces phénomènes d'animalisation apparaît fort probable.

Le blocage des groupes fonctionnels des chaînes latérales est à l'origine d'importants changements dans les propriétés et la structure des protéines. En effet les relations d'association des protéines entre elles et avec d'autres éléments cellulaires étant largement conditionnées par la nature, le nombre et la position de ces groupes, leur blocage entraîne d'importantes conséquences sur ces phénomènes d'association. Ceux-ci jouant sans aucun doute un rôle important au cours du développement (Frey-Wyssling, 1948), on conçoit ainsi l'efficacité de certains métaux lourds sur les processus de la détermination embryonnaire. La position des ions à l'égard des problèmes de structure apparaît d'ailleurs remarquable. D'une part les ions de métaux alcalins et alcalino-terreux, au rôle physiologique essentiel, peu aptes à former des complexes avec les protéines 'dynamisent les structures' grâce à leur haute capacité d'échange. D'autre part, les ions de métaux lourds en formant des complexes à stabilité élevée avec les protéines introduisent un facteur d'inertie dans la vie cellulaire, interférant ainsi dans l'édification et le renouvellement permanent des structures au cours du développement.

L'étude du mode d'action des ions de métaux lourds offre ainsi une voie d'accès à l'analyse de la détermination embryonnaire. L'analyse du mode d'action du zinc et du nickel notamment par la comparaison de leurs effets et de leur aptitude intrinsèque à former des complexes jointe à l'étude de leur répartition dans les différentes structures cellulaires apparaît comme une voie nouvelle pour l'étude du déterminisme de l'animalisation.

RÉSUMÉ

Les effets animalisants du zinc sur le développement de l'œuf d'oursin *Paracentrotus lividus* sont étudiés et comparés avec les effets d'autres métaux présentant des propriétés voisines: Ni, Co, Mn et Fe.

Avec le chlorure de nickel (1/1 000) la formation de l'archentéron est supprimée. Les blastulas sont couvertes de cils courts. La touffe ciliée apicale n'est pas formée.

Avec le chlorure de nickel (1/5 000 et 1/10 000) les embryons présentent une organisation à symétrie radiale.

Avec le chlorure de cobalt, la gastrulation est perturbée et le développement est inhibé.

Le zinc est mis en évidence dans les embryons traités à différents stades du développement par la coloration rouge qu'il développe en présence de dithizone. Le métal est réparti dans le mésenchyme et dans l'entoderme chez les jeunes stades. Dans les pluteus le zinc apparaît fixé dans les cellules pigmentaires.

Le nickel est détecté par les réactions colorées qu'il donne avec la diméthylglyoxime et avec l'α-furil-dioxime. Le nickel est mis en évidence dans le mésenchyme de la jeune blastula.

La réaction colorée donnée par la dithizone en présence du zinc n'est pas modifiée par des lavages préalables avec une solution de Complexone. Le zinc fixé sur les embryons peut être déplacé par les ions mercuriques.

L'acide p. chloromercuribenzoïque bloque le développement des embryons cultivés en présence de chlorure de zinc. Les groupes sulfhydriles n'apparaissent pas jouer un rôle essentiel dans l'animalisation par le zinc.

Le rôle du zinc dans l'animalisation de l'œuf d'oursin est discuté en fonction de la formation de complexes entre le métal et les protéines.

SUMMARY

The animalizing effects of zinc on the development of eggs of the sea-urchin, *Paracentrotus lividus*, were studied and compared with the effects of other closely related metals: nickel, cobalt, manganese, and iron.

Nickel chloride (1/1,000) suppressed the formation of an archenteron. The blastulae were covered with short cilia. The apical tuft was not formed.

Nickel chloride (1/5,000 and 1/10,000) induced the formation of radial larvae.

Cobalt chloride disturbed gastrulation and inhibited development.

Zinc was detected in the embryos at various stages of development by the formation of a deep red colour with dithizone. Zinc appeared to be distributed in the mesenchyme and entoderm of the young stages. In the pluteus, it appeared to be fixed in the pigment cells.

Nickel was located by the colour reactions with dimethylglyoxime and α-furil-dioxime. The colour was developed in the mesenchyme of the young blastula.

The colour reaction with dithizone was not modified by previous washings with Complexone (ethylene-diamine tetra-acetic acid) solution.

Zinc fixed in the embryos could be displaced by mercury ions.

With the addition of *p*-chloro-mercuribenzoic acid, the development of embryos in zinc chloride was blocked. The sulfhydryl groups do not appear to be essential for animalization by zinc ions.

The role of zinc in the animalization of sea-urchin eggs is discussed as a function of the formation of complexes between metal and proteins.

Ce travail a été effectué au Laboratoire Arago à Banyuls sur Mer (P.O.). J'adresse mes remerciements au Directeur, Monsieur le Professeur G. Petit, au

sous-Directeur, Monsieur le Docteur C. Delamare-Debouteville et à Monsieur le Docteur P. Bougis, pour les facilités de travail qu'ils m'ont procurées pendant mon séjour. L'acide p. chloromercuribenzoïque m'a été fourni par Monsieur le Professeur J. Brachet, et je lui exprime ici tous mes remerciements.

TRAVAUX CITÉS

ALBERT, A. (1952). Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for trace metals. II. Amino acids having three ionizing groups. *Biochem. J.* **50,** 690–7.

BERNOT, J. (1947). *Réactifs organiques en analyse minérale* (par l'équipe du laboratoire de recherches de Hopkin et Williams, Ltd.). Paris: Dunod.

FREY-WYSSLING, A. (1948). *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its derivatives.* London: Elsevier.

FUJII, T. (1954). Notes on presence of zinc in nucleoli and in the sperm middle piece in some marine forms. *Annot. zool. jap.* **3,** 115–17.

GURD, F. R. N., & GOODMAN, D. S. (1952). Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXXII. The interaction of human serum albumin with Zn ions. *J. Amer. chem. soc.* **74,** 670–5.

GUSTAFSON, T., & SÄVHAGEN, R. (1950). Studies on the determination of the oral side of the sea-urchin egg. I. The effects of some detergents on the development. *Ark. Zool.* A **42,** 10, 1–6.

HELLERMAN, L., CHINARD, F. P., & DEITZ, V. R. (1943). Proteins, sulfhydryl groups and the reversible inactivation of the enzyme urease. The reducing groups of egg albumin and of urease. *J. biol. Chem.* **147,** 443–62.

HERBST, C. (1892). Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der veränderten chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums auf die Entwicklung der Tiere. I. Versuche an Seeigeleiern. *Z. wiss. Zool.* **55,** 446–518.

HÖRSTADIUS, S. (1935). Über die Determination im Verlaufe der Eiachse bei Seeigeln. *Pubbl. Staz. zool. Napoli,* **14,** 251–429.

—— & GUSTAFSON, T. (1954). The effect of three antimetabolites on sea-urchin development. *J. Embryol. exp. Morph.* **2,** 216–26.

LALLIER, R. (1955*a*). Effets des ions zinc et cadmium sur le développement de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus. Archives de Biologie, Liège et Paris,* **66,** 75–102.

—— (1955*b*). Animalisation de l'œuf d'oursin par les colorants azoïques et les bleus d'aniline sulfonés. *Exp. Cell Res.* **9,** 232–40.

—— (1955*c*). Recherches sur la détermination embryonnaire chez les Échinodermes. L'action des oxydants et de l'acide p. chloromercuribenzoïque sur le développement de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* (sous presse).

LEHNINGER, A. L. (1950). Role of metal ions in enzyme systems. *Physiol. Rev.* **30,** 393–429.

LINDAHL, P. E. (1936). Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im Seeigelkeim. *Acta zool. Stockh.* **17,** 179–365.

MARTELL, A. E., & CALVIN, M. (1952). *Chemistry of metal chelate compounds.* New York: Prentice-Hall.

MEIER, K. E., & KAUNAT, H. (1954). Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. *Naturwissenschaften,* **11,** 261.

PERKINS, D. J. (1953). A study of the effect of amino acid structure on the stabilities of the complexes formed with metals of group II of the periodic classification. *Biochem. J.* **55,** 649–52.

TANFORD, C. (1952). The effect of pH on the combination of serum albumin with metals. *J. Amer. chem. Soc.* **74,** 211–15.

WATERMAN, A. J. (1937). Effect of salts of heavy metals on development of the sea-urchin *Arbacia punctulata. Biol. Bull. Wood's Hole,* **73,** 401–20.

WILLIAMS, R. J. P. (1953). Metal ions in biological systems. *Biol. Rev.* **28,** 381–415.

(Manuscript received 12:xi:55)